



УДК 543.51:542.61

Магнитная сепарация как альтернативный способ экстракции допинговых препаратов новых классов из мочи человека

Суханова И.И., Дикунец М.А., Вирюс Э.Д.,
Соболевский Т.Г., Родченков Г.М.

*ФГУП «Антидопинговый центр» Министерства спорта, туризма и молодежной политики
Российской Федерации, Москва*

Поступила в редакцию 14.10.2011 г.

Аннотация

Для извлечения допинговых препаратов из проб мочи разработан новый способ экстракции, основанный на применении метода магнитной сепарации (МС) с использованием ферромагнитных микрочастиц с сорбционной поверхностью, модифицированной группами C18. На его основе предложен способ определения допинговых препаратов последнего поколения – селективных модуляторов андрогенных рецепторов (СМАР) и агонистов дельта-рецепторов активации пролиферации пероксисом (δ -РАПП) методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с tandemной масс-спектрометрией. Оптимизированы условия проведения жидкостно-жидкостной и твердофазной экстракции для извлечения указанных препаратов из мочи человека. Для всех исследуемых соединений определены подавление ионизации компонентами матрицы и степень извлечения веществ. Проведено сравнение МС с традиционными способами экстракции. Показано, что МС может успешно применяться в практике допинг-контроля для извлечения из мочи СМАР и агонистов δ -РАПП.

Ключевые слова: допинговый контроль, магнитная сепарация, селективный модулятор андрогенных рецепторов, агонист дельта-рецепторов активации пролиферации пероксисом, жидкостно-жидкостная экстракция, твердофазная экстракция.

New extraction procedure for the detection of doping substances was proposed. It is based on magnetic separation with surface modified ferromagnetic micro-particles. The method for detection of the new doping classes such as selective androgen receptor modulators (SARM) and peroxisome proliferators-activated receptor agonists (PPAR δ) was developed. Liquid-liquid and solid phase extraction conditions of these doping substances were optimized. Comparison of three extraction methods was performed. It was showed that magnetic separation can be used for doping control as alternative extraction method prior to HPLC-MS/MS analysis.

Keywords: Doping control, magnetic separation, selective androgen receptor modulator, peroxisome-proliferator activated receptor- δ , liquid-liquid extraction, solid phase extraction

Введение

В последние годы высокоэффективная жидкостная хроматография в сочетании с tandemной масс-спектрометрией (ВЭЖХ–МС/МС) стала входить в

практику допингового контроля [1,2]. Этот высокочувствительный метод анализа в сочетании с ионизацией электрораспылением требует предварительной очистки образца для снижения эффекта подавления ионизации определяемых соединений компонентами матрицы. Сегодня основными процедурами пробоподготовки мочи в практике допингового контроля являются жидкостно-жидкостная экстракция (ЖЖЭ) и твердофазная экстракция (ТФЭ).

Основными достоинствами ЖЖЭ являются универсальность, простота, доступность оборудования для проведения экстракции. Основными ограничениями метода являются невысокие значения коэффициентов распределения многих веществ, расход большого количества токсических органических растворителей, сложность автоматизации, необходимость упаривания образца.

Метод ТФЭ, который интенсивно развивается, начиная с 1970-х годов как альтернатива ЖЖЭ, позволяет более селективно и количественно извлекать соединения [3]. Основным ограничением метода, как и в случае ЖЖЭ, является длительная процедура упаривания.

В связи с тем, что такие традиционные способы пробоподготовки биожидкостей человека, как ЖЖЭ и ТФЭ, имеют ряд ограничений, разработка нового способа экстракции, который позволял бы селективно извлекать вещества и приводил к более низкой степени подавления ионизации определяемых соединений компонентами матрицы, является актуальной аналитической задачей. Не менее важным требованием к новому способу экстракции является экспрессность и простота пробоподготовки. Таким перспективным способом экстракции соединений из биожидкостей мог бы стать метод магнитной сепарации (МС). Принцип МС заключается в концентрировании исследуемых соединений на поверхности сорбента, носитель которого обладает суперпарамагнитными свойствами. Благодаря этим свойствам, микрочастицы мигрируют к магниту, только когда попадают в магнитное поле. После прекращения действия магнитного поля они мгновенно теряют свои магнитные свойства и легко превращаются в суспензию. Это позволяет упростить и ускорить процедуру отбора экстракта после элюирования и исключить стадию упаривания.

МС нашла широкое применение в биохимии для выделения популяций клеток, субклеточных культур, белков и ДНК [4]. Однако опубликованы всего несколько работ по использованию магнитных микрочастиц в качестве сорбента для извлечения низкомолекулярных веществ, например, фенольных соединений из водных образцов [5] и противогрибкового средства интраконазола из плазмы человека [6,7]. Нами предложено использовать МС для извлечения лекарственных средств из такой сложной матрицы, как моча человека [8]. До настоящей работы данные по сравнительному анализу МС с традиционными способами экстракции, такими как ЖЖЭ и ТФЭ, в литературе отсутствуют.

В качестве объектов исследования выбраны допинговые препараты новых классов – селективные модуляторы андрогенных рецепторов (СМАР) и агонисты дельта-рецепторов активации пролиферации пероксисом (δ -РАПП). СМАР воздействуют на андрогенные рецепторы, ответственные за рост мышечных волокон, и обладают анаболическими свойствами, приводящими к увеличению мышечной массы и силы [9]. Активация δ -РАПП стимулирует сжигание жировых клеток, являющихся энергетическим депо живых организмов, что приводит к одновременному увеличению выносливости и силы за счет изменения метаболических процессов в мышечных тканях [10]. СМАР и агонисты δ -РАПП, находящиеся на заключительной стадии клинических испытаний, потенциально могут использоваться спортсменами в качестве допинга, поэтому с 2009 года они

были включены в Запрещенный список веществ и методов Всемирного антидопингового агентства (ВАДА) [11].

Цель данной работы – разработка нового способа извлечения из мочи СМАР и агонистов δ -РАПП методом МС для последующего ВЭЖХ–МС/МС анализа и его сравнение с общепринятыми способами экстракции в допинговом контроле.

Эксперимент

ВЭЖХ–МС/МС анализ выполняли на масс-спектрометре с тройным квадрупольным масс-анализатором TSQ Quantum Ultra фирмы Thermo Scientific (США), соединенным с высокоэффективным жидкостным хроматографом модели Surveyor, оснащенным автосамплером, насосом высокого давления, дегазатором и блоком для термостатирования хроматографической колонки. При анализе использовали колонку Luna C18(2) фирмы Phenomenex, США (3.0×150 мм, размер частиц 5 мкм, размер пор 100 Å). В качестве подвижной фазы использовали 0.25% раствор муравьиной кислоты с 0.2 мМ раствором ацетата аммония (pH=3.0) (А) и метанол (В).

Для разделения веществ использовали градиентное элюирование: 0 мин – 40% В, 1 мин – 90% В, 14.1 мин – 40% В. Скорость потока: 0 мин – 0.2 мл мин⁻¹, 1-5 мин – 0.25 мл мин⁻¹, 5-9 мин – 0.2 мл мин⁻¹, 9-14 мин – 0.35 мл мин⁻¹, 14.1 мин – 0.2 мл мин⁻¹. Время анализа с учетом стабилизации системы перед вводом следующего образца составляло 18 мин. Для понижения общего рабочего давления системы использовали термостатирование колонки (50°C). Объем пробы, вводимой в хроматограф – 10 мкл.

Масс-спектры исследуемых соединений получали в условиях электрораспылительной ионизации с нагреваемым потоком с регистрацией отрицательных ионов. Условия электрораспылительной ионизации: напряжение на капилляре 3.8 кВ; температура фокусирующего капилляра 270°C; скорость потока осушающего газа (азот) 0.45 л/мин; скорость потока вспомогательного газа (азот) 0.075 л/мин; температура в камере ионизации 200°C. Ширина пропускания ионов на первом и третьем квадруполе составила 0.5 а.е.м. Для столкновительной диссоциации ионов исследуемых соединений в ячейку столкновений подавали аргон.

Реагенты и материалы

Соединения S-4, S-24, LGD2226 с содержанием основного компонента более 95% синтезированы в Центре превентивных допинговых исследований Института биохимии немецкого спортивного университета Кельна. GW0742 получено от Sigma-Aldrich, Германия; GW501516 – от Alexis, США и имели содержание основного компонента 99%. В качестве внутренних стандартов использовали флюоксиместерон, метилтестостерон и мефрузид (LGC Standards, Германия) с содержанием основного компонента 99%. Исходные растворы веществ готовили растворением точных навесок в метаноле «для хроматографии», рабочие растворы получали разбавлением и хранили до анализа при температуре +4°C.

Для приготовления подвижной фазы использовали метанол «для хроматографии» (Merck, Германия), ацетат аммония (Acros Organics, Бельгия), муравьиную кислоту (Merck, Германия) и деионизированную воду «для хроматографии» (Biosolve, Нидерланды).

Для ЖЖЭ использовали метил-*трет*-бутиловый эфир (МТБЭ) (Sigma-Aldrich, Германия), толуол (ХимМед, Россия), диэтиловый эфир (ДЭЭ) (ХимМед

Синтез, Россия), изопропанол (Fisher Scientific, Германия), пентан (Sigma-Aldrich, Германия) и гексан (Panreac, Испания). Хлорид натрия, сульфат натрия, гидроксид натрия, гидрокарбонат натрия и карбонат калия получены от ХимМед, Россия, сульфат аммония – Panreac, Испания, ацетат натрия – Sigma, Германия. ЖЖЭ проводили на автоматическом шейкере фирмы Glas-Col, США, pH растворов измеряли с помощью pH-метра фирмы Mettler-Toledo, Швейцария. Для получения контрастной поверхности раздела между органической и водной фазами использовали центрифугу марки Rotina 420 фирмы Hettich, Германия.

Для проведения ТФЭ использовали концентрирующие картриджи: AccuBond II ODS-C-18 (100 мг × 1 мл, Agilent Technologies, США), Adsorbex RP-18 (100 мг × 3 мл, Merck, Германия), Bond Elut-Certify (130 мг × 3 мл, Varian, США), Oasis MCX (30 мг × 1 мл, Waters, США), Oasis WAX (30 мг × 1 мл, Waters, США), Oasis MAX (30 мг × 1 мл, Waters, США), Strata-UBJ (60 мг × 3 мл, Phenomenex, США), Strata-TAK (30 мг × 1 мл, Phenomenex, США), Resprep C-18 (200 мг × 3 мл, Restek, США), Resprep C-18 (500 мг × 3 мл, Restek, США), Resprep C-8 (200 мг × 3 мл, Restek, США), Resprep C-8 (500 мг × 3 мл, Restek, США), Resprep C-2 (200 мг × 3 мл, Restek, США), Resprep SAX (500 мг × 3 мл, Restek, США), Resprep SCX (500 мг × 3 мл, Restek, США), Resprep BenzSCX (200 мг × 3 мл, Restek, США), Resprep NH₂ (200 мг × 3 мл, Restek, США), Resprep COOH (500 мг × 3 мл, Restek, США). Экстракцию проводили на экстракторе с положительным давлением модели Cerex фирмы Crawford Scientific Ltd., Великобритания, совмещенным с генератором азота фирмы Peak Scientific, США. Для упаривания органического экстракта использовали упариватель фирмы Barnstead Inc., США, совмещенный с генератором азота.

Для проведения магнитной сепарации использовали ферромагнитные микрочастицы размером 1 мкм и концентрацией 12.5 мг/мл: Dynabeads RPC18, Dynabeads SAX, Dynabeads SCX, Dynabeads WCX (Invitrogen Dynal AS, Норвегия). Для промывки магнитных частиц применяли трифторуксусную кислоту (Macherey-Nagel, Германия), устройства для перемешивания Dynabeads MX Mixer (Invitrogen Dynal AS, Норвегия) и Vortex-1, (Scientific Industries, США), магнитный сепаратор DynaMag-2 (Invitrogen Dynal AS, Норвегия).

Подготовка образцов к анализу

Жидкостно-жидкостная экстракция

К 1 мл мочи добавляли 10 мкл раствора внутреннего стандарта, содержащего флюоксиместерон (50 нг/мкл), мефрузид (10 нг/мкл) и метилтестостерон (10 нг/мкл). Для создания pH 5-6 использовали ацетатный буфер, для pH 3.5-4.0 – концентрированную муравьиную кислоту, для pH 9.5-10.0 – смесь гидрокарбоната натрия и карбоната калия (1:2), для pH 12-14 – 5 М раствор гидроксида натрия. Затем добавляли 0.4 г высаливателя, экстрагировали 3 мл органического растворителя в течение 10 мин, органический растворитель отбирали и упаривали досуха в токе азота. Сухой остаток перерастворяли в 150 мкл смеси метанол/вода (50:50, об.%).

Твердофазная экстракция

К 1 мл мочи добавляли 10 мкл раствора внутреннего стандарта. Картридж предварительно кондиционировали 3 мл метанола и промывали 3 мл деионизированной воды, пропускали исследуемый образец, вновь промывали 3 мл деионизированной воды, сушили в течение 5 мин в токе азота. Вещества элюировали с концентрирующего картриджа 3 мл МТБЭ, который затем упаривали в токе азота. Сухой остаток перерастворяли в 150 мкл смеси метанол/вода (50:50, об.%).

Магнитная сепарация

Для подготовки ферромагнитных частиц перед анализом наливали 200 мкл коммерчески доступной суспензии микрочастиц с концентрацией 12.5 мг/мл в пробирку типа «эппендорф», помещали в магнитный сепаратор, удаляли надосадочную жидкость, согласно инструкции промывали 1 мл раствора трифторуксусной кислоты (0.1%). После удаления кислоты добавляли 2 мл деионизированной воды для получения раствора частиц с концентрацией 1.25 мг/мл, который использовали в дальнейшем.

К 1 мл мочи добавляли 10 мкл внутреннего стандарта. Добавляли 200 мкл суспензии магнитных микрочастиц с концентрацией 1.25 мг/мл, перемешивали, надосадочную жидкость удаляли на магнитном сепараторе, частицы промывали деионизированной водой (500 мкл), которую затем удаляли с применением магнитного сепаратора. Элюирование исследуемых соединений проводили 100 и 50 мкл метанола в две стадии. Фракции объединяли, перемешивали и анализировали вместе.

В работе оценена степень подавления ионизации определяемых веществ компонентами матрицы. Для этого 5 мкл раствора (10 нг/мкл) смеси определяемых соединений и 10 мкл раствора внутренних стандартов упаривали досуха в токе азота. Полученный сухой остаток перерастворяли в 150 мкл смеси метанол/вода (50:50, об.%) или в полученном в результате пробоподготовки экстракте мочи, не содержащей запрещенных допинговых препаратов.

Для оценки степени извлечения веществ из матрицы проводили анализ 5 различных образцов мочи с добавкой в них до и после экстракции определяемых соединений (50 нг/мл). Внутренние стандарты добавляли во все пробы после проведения экстракции, после чего рассчитывали соотношения площадей пиков характеристичных ионов определяемых соединений к площади внутреннего стандарта. Предполагали, что соотношение площадей, полученных для определяемых соединений, добавленных после проведения пробоподготовки, соответствует 100%-ной экстракции.

Обсуждение результатов

При определении соединений методом ВЭЖХ–МС/МС наиболее чувствительным режимом является регистрация выбранных реакций (selective reaction monitoring). Ранее нами были показаны пути фрагментации СМАР и агонистов δ -РАПП и выбраны характеристичные ионы для их селективного определения методом ВЭЖХ–МС/МС [12,13]. Структуры соединений и их основные характеристичные ионы, образующиеся в результате столкновений в камере соударения иона-предшественника с атомами аргона и использующиеся для подтверждения наличия вещества в пробе, представлены в табл. 1.

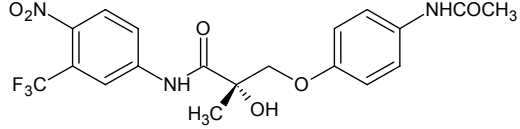
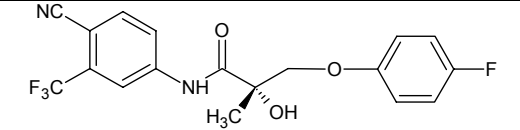
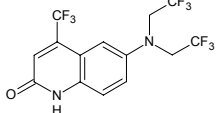
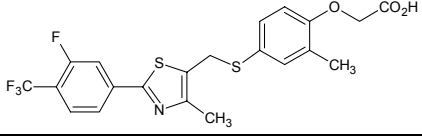
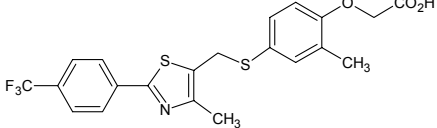
Согласно требованиям ВАДА, предел обнаружения СМАР и агонистов δ -РАПП в моче должен составлять 50 нг/мл, поэтому степень извлечения исследуемых соединений и эффект подавления их ионизации компонентами матрицы изучали именно для этой концентрации.

Жидкостно–жидкостная экстракция

Первым этапом работы была оптимизация условий проведения ЖЖЭ СМАР и агонистов δ -РАПП из мочи. При оптимизации условий экстракции варьировали следующие параметры: органический растворитель, высаливающий агент, pH раствора и время экстракции.

Судя по структурам соединений, представленным в табл. 1, можно предположить, что они будут иметь различные коэффициенты распределения. В связи с тем, что необходимо разработать способ одновременного извлечения СМАР и агонистов δ -РАПП, то следовало выбрать тот экстрагент, который количественно бы извлекал все исследуемые соединения. Установлено, что такие неполярные растворители, как гексан и пентан практически не экстрагируют СМАР и агонисты δ -РАПП за исключением S-24 и LGD2226 (рис. 1).

Таблица 1. Исходные ионы и ионы-продукты определяемых соединений

Соединение	Структурная формула	Исходный ион, m/z	Ион-продукт, m/z
S-4		$[M-H]^-$ 440	150
			261
			205
S-24		$[M-H]^-$ 381	185
			241
			111
LGD2226		$[M-H]^-$ 391	239
			308
			211
			184
GW0742		$[M-H]^-$ 470.5	138
			413
			139
GW501516		$[M-H]^-$ 452	138
			394
			151

При использовании более полярных растворителей (ДЭЭ, МТБЭ) степень экстракции из мочи всех исследуемых соединений возрастает. Использование смесей растворителей разной степени полярности, ДЭЭ с толуолом или ДЭЭ с изопропанолом, не приводит к значительному увеличению степени извлечения определяемых веществ. При сопоставимых степенях извлечения исследуемых соединений различными растворителями заметно меньшее подавление ионизации СМАР и агонистов δ -РАПП компонентами матрицы (не более 22%) наблюдали при экстракции ДЭЭ, поэтому он был выбран для дальнейшей работы.

Известно, что экстракция возможна, если растворимость соединения в органическом растворителе выше, чем в воде. С уменьшением растворимости исследуемых соединений в водной фазе их степень извлечения возрастает. Понижения растворимости органических веществ в водных растворах можно добиться добавлением хорошо растворимых в воде солей. При сравнении высаливающих агентов, наиболее часто используемых в практике допинг-контроля, установлено, что степень извлечения соединений увеличивалась в ряду хлорид натрия < сульфат натрия < смесь сульфата натрия с сульфатом аммония < сульфат аммония. Стоит отметить, что значения степени извлечения исследуемых веществ при использовании сульфата аммония и смеси сульфата натрия с сульфатом

аммония сопоставимы, однако эффект подавления ионизации определяемых соединений компонентами матрицы был значительно ниже при использовании сульфата аммония.

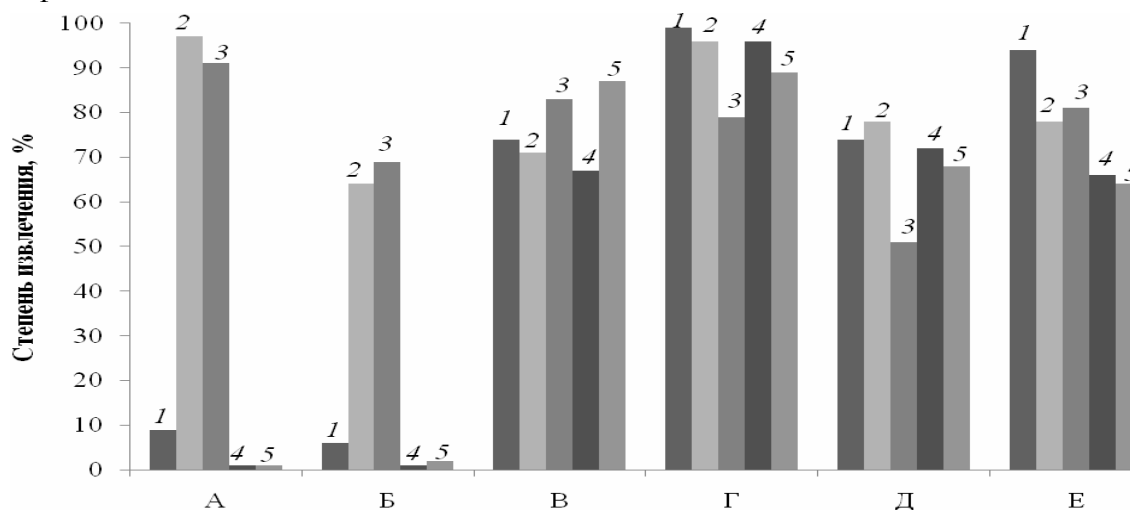


Рис. 1. Влияние природы растворителя на степень извлечения из мочи СМАР и агонистов δ -РАПП ($P=0.95$, $n=5$, $s=7-20\%$) (s – стандартное отклонение).

Растворители: А – гексан, Б – пентан, В – смесь ДЭЭ/изопропанол (95:5, об.%), Г – МТБЭ, Д – смесь ДЭЭ/толуол (50:50, об.%), Е – ДЭЭ. *Исследуемые соединения:* 1 – S-4, 2 – S-24, 3 – LGD2226, 4 – GW0742, 5 – GW501516

Нами изучено влияние pH раствора на степень извлечения допинговых препаратов новых классов из биожидкости человека. Показано, что изменение pH среды приводит к незначительному изменению степени извлечения всех исследуемых соединений. В качестве оптимального значения pH было выбрано 9.6, так как в данном случае наблюдали наименьший эффект подавления ионизации определяемых соединений компонентами матрицы (рис. 2).

Показано, что для установления термодинамического равновесия между водной и органической фазами достаточно 10 мин. Дальнейшее увеличение времени экстракции не приводит к значительному увеличению степени извлечения. Таким образом, оптимальными условиями для проведения ЖЖЭ являются: растворитель – ДЭЭ, высаливающий агент – сульфат аммония, pH 9.5-10 и время экстракции – 10 мин.

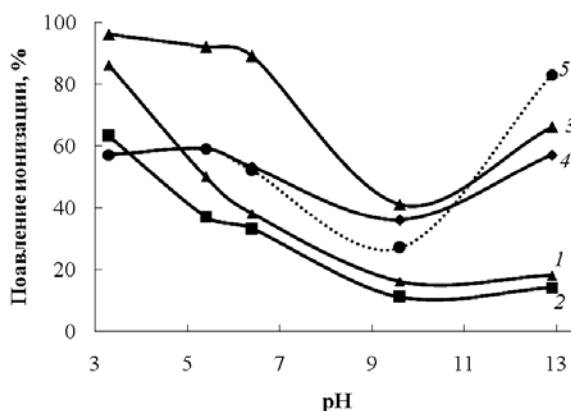


Рис. 2. Влияние pH раствора на подавление ионизации СМАР и агонистов δ -РАПП компонентами матрицы ($P=0.95$, $n=5$, $s=5-18\%$). *Исследуемые соединения:* 1 – S-4, 2 – S-24, 3 – LGD2226, 4 – GW0742, 5 – GW501516

Твердофазная экстракция

ТФЭ, основанная на процессах сорбции и десорбции, широко вошла в практику допингового контроля для разделения и концентрирования веществ. Эффективность ТФЭ зависит от сродства определяемых соединений к сорбенту. Выбрав оптимальный сорбент и элюент, можно добиться высокой степени концентрирования определяемого компонента и степени очистки экстракта. Для концентрирования органических веществ обычно используют химически модифицированные кремнеземы с привитыми октадецильными, гексадецильными, октильными, этильными, циклогексильными и фенильными группами со средним размером частиц 40-60 мкм [14]. Адсорбенты для ТФЭ по механизму взаимодействия с аналитом подразделяются на три группы: обращенно-фазовые, нормально-фазовые и ионообменные. Ионообменные в свою очередь – на катионообменные и анионообменные.

В ходе исследований отмечено, что сорбенты с ионообменными свойствами не позволяют селективно извлекать все исследуемые соединения из матрицы. Так, например, при использовании анионообменников степень извлечения агонистов δ -РАПП не превышает 30% (табл. 2). Хотя при переходе к сорбентам с катионообменными свойствами степени извлечения агонистов δ -РАПП возрастали в два раза, они оставались низкими и составляли порядка 60%.

Таблица 2. Влияние природы сорбента на степень извлечения СМАР и агонистов δ -РАПП из мочи человека при использовании МС ($P=0.95$, $n=5$, $s=8-22\%$)

Сорбент	Соединение				
	S-4	S-24	LGD2226	GW0742	GW501516
Oasis WAX	93	96	67	25	23
Oasis MAX	60	63	67	5	5
Resprep SAX	75	70	61	31	29
Resprep NH ₂	75	72	58	27	26
Resprep COOH	47	61	57	56	56
Oasis MCX	39	64	59	57	62
Resprep SCX	32	75	51	56	54
Resprep BenzSCX	50	77	67	66	64
Resprep C-2	9	9	4	4	5
Resprep C-8	75	87	54	27	40
Resprep C-18	84	88	56	26	34
AccuBond II ODS-C18	96	75	35	63	63
Adsorbex RP-18	97	64	33	48	51
Bond Elut-Certify	97	94	97	67	72
Strata-UBJ	24	64	95	39	37
Strata-TAK	19	81	61	45	55

При использовании сорбентов с обращенно-фазовыми свойствами важным параметром, определяющими эффективность извлечения органических веществ на химически модифицированных кремнеземах с привитыми группами, является длина модифицирующего фрагмента. Известно, что чем длиннее углеводородная цепь, тем выше гидрофобность сорбента и тем эффективнее извлечение неполярных

органических соединений. Сравнение степени извлечения из мочи допинговых препаратов последнего поколения с использованием сорбентов с гидрофобными свойствами показало, что с увеличением длины углеводородной цепи с С-2 до С-18 возрастает степень извлечения всех исследуемых соединений.

Наибольшую степень извлечения СМАР и агонистов δ -РАПП из мочи человека наблюдали при использовании картриджей Bond Elut-Certify (табл. 2), которые содержат новый патентованный полимерный сорбент, обладающий одновременно гидрофобными и катионообменными свойствами. Это позволяет задействовать различные механизмы удерживания соединений с сорбентом, такие как ковалентные, ионные, Ван-дер-Ваальсовы и водородные связи, и приводит к более эффективной очистке и селективному концентрированию веществ из матрицы. Данный сорбент был выбран для дальнейшей работы.

Большинство методов определения органических веществ после сорбционного концентрирования включает стадию десорбции. При десорбции можно варьировать природу и полярность жидкой фазы в широких пределах, изменяя силу взаимодействия сорбента и сорбата с растворителем. Очевидно, что идеальным для десорбции является растворитель, молекулы которого взаимодействуют с поверхностью сорбента сильнее, чем молекулы сорбата, но при этом также взаимодействуют и с молекулами сорбата. В случае сорбентов на основе силикагеля необходимо обеспечить элюенту контакт с привитой фазой. Так как химически модифицированные кремнеземы состоят из кремниевой матрицы, имеющей большую полярность по сравнению с гидрофобным привитым алканом, элюент должен сольбилизовать поверхность как кремнезема, так и привитый углеводородный слой. Обычно для этих целей подходят метанол, ацетонитрил и другие органические растворители, смешивающиеся с водой [14]. Аналогичный подход к выбору растворителя используется и при работе с гидрофобными полимерными сорбентами. При десорбции исследуемых СМАР и агонистов δ -РАПП с поверхности сорбента картриджа Bond Elut-Certify различными растворителями наименьшую степень экстракции наблюдали при элюировании изопропанолом. При сравнении таких растворителей как ДЭЭ, ацетонитрил, метанол и МТБЭ значения степеней извлечения были сопоставимы (рис. 3). Однако при использовании последнего эффект подавления ионизации исследуемых соединений компонентами матрицы был минимальный и не превышал 10%.

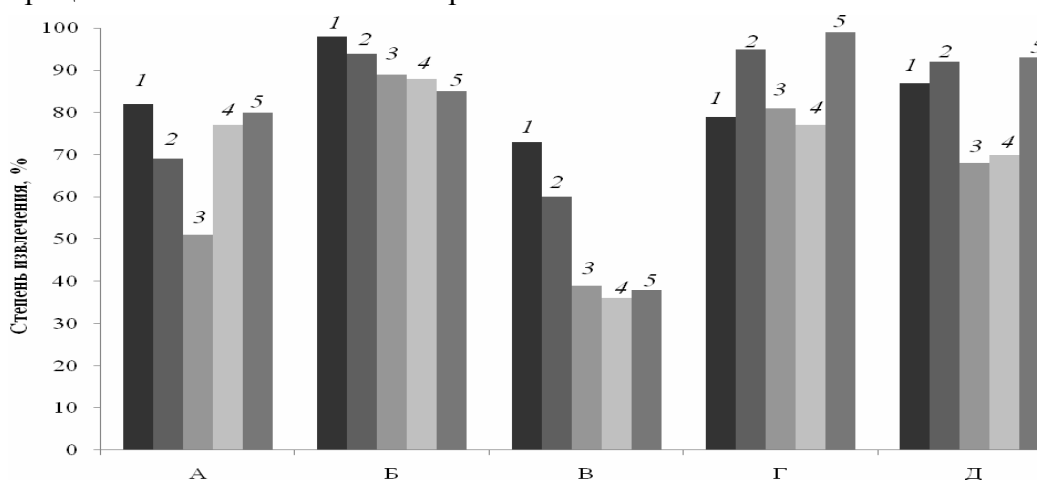


Рис. 3. Влияние природы растворителя на степень извлечения СМАР и агонистов δ -РАПП из мочи человека ($P=0.95$, $n=5$, $s=9-19\%$). Растворители: А – ДЭЭ, Б – МТБЭ, В – изопропанол, Г – ацетонитрил, Д – метанол. Исследуемые соединения: 1 – S-4, 2 – S-24, 3 – LGD2226, 4 – GW0742, 5 – GW501516

Важным критерием при разработке условий проведения ТФЭ является правильный выбор объема элюента. Использование малых количеств органического растворителя не позволяет количественно десорбировать исследуемые соединения с поверхности сорбента, а больших – приводит к значительному возрастанию временных затрат за счет увеличения времени упаривания. В условиях нашего эксперимента 3 мл МТБЭ оказалось достаточно для количественного извлечения всех исследуемых СМАР и агонистов δ -РАПП с поверхности сорбента Bond Elut-Certify.

Магнитная сепарация

При извлечении органических веществ из биожидкости человека с применением МС эффективность экстракции зависит от сродства определяемых соединений к поверхности частиц, поэтому при выборе оптимальных условий проведения экстракции исследовали влияние природы, объема сорбента и элюирующих органических растворителей.

Нами было показано [8], что для экстракции из мочи СМАР и агонистов δ -РАПП целесообразно использовать 200 мкл суспензии магнитных частиц с концентрацией 1.25 мг/мл (масса сорбента 0.25 мг), а в качестве растворителя (элюента) – 150 мкл метанола. В данной работе использовали четыре вида частиц Dynabeads с поверхностями, модифицированной различными функциональными группами, и обладающими гидрофобными (C18), сильными анионообменными (SAX), с сильными катионообменными (SCX) и слабыми катионообменными свойствами (WCX). Поскольку в данном случае сорбент является суспензией магнитных частиц, то комбинируя и смешивая в разных пропорциях частицы различных типов, можно получать сорбенты с желаемыми свойствами.

Таблица 3. Влияние природы сорбента на степень извлечения СМАР и агонистов δ -РАПП из мочи человека ($P=0.95$, $n=5$, $s=5-10\%$)

Сорбент	Соединение				
	S-4	S-24	LGD2226	GW0742	GW501516
100% SAX	65	69	56	52	58
100% SCX	34	71	62	63	59
100% WCX	44	60	52	70	58
100% C18	97	98	98	97	96
75% C18+25% SAX	96	97	98	97	92
75% C18+25% SCX	96	98	68	94	95
75% C18+25% WCX	98	95	65	96	98
50% C18+ 50% SAX	80	86	56	71	76
50% C18+ 50% SCX	59	81	67	69	73
50% C18+ 50% WCX	67	90	61	73	80
25% C18+ 75% SAX	70	82	40	61	69
25% C18+ 75% SCX	53	76	66	66	62
25% C18+ 75% WCX	58	81	60	73	71
50% SAX+50% SCX	14	36	14	36	28
50% SAX+50% WCX	24	51	21	47	47
50% WCX+50% SCX	36	54	28	65	54

Показано, что использование частиц с ионообменными свойствами SAX, SCX, WCX, а также их различных сочетаний между собой нецелесообразно, поскольку не удавалось одновременно количественно извлекать все исследуемые соединения. Добавление к этим частицам сорбента типа C18 приводило к лучшей экстракции СМАР и агонистов δ -РАПП из мочи. По мере увеличения объемной доли частиц с поверхностью, модифицированной группами C18, степень извлечения исследуемых соединений возрастала (табл. 3). При использовании частиц только с поверхностью, модифицированной модифицированной группами C18, степень извлечения допинговых препаратов была максимальной и приближалась к 100%, в то время как эффект подавления ионизации соединений компонентами матрицы сводился к минимуму и не превышал 5%.

Заключение

Для извлечения допинговых препаратов из проб мочи предложен новый способ экстракции, основанный на применении МС с использованием магнитных микрочастиц с поверхностью, модифицированной группами C18. На его основе предложен способ определения СМАР и агонистов δ -РАПП методом ВЭЖХ–МС/МС. Оптимизированы условия проведения ЖЖЭ и ТФЭ для извлечения из мочи человека допинговых препаратов новых классов. Проведено сравнение МС с общепринятыми способами экстракции. Показано, что при использовании МС наблюдали самую высокую степень извлечения (76-98%) и низкий эффект подавления ионизации соединений компонентами матрицы (1-5%). Показано, что МС может успешно применяться в практике допинг-контроля для извлечения из мочи СМАР и агонистов δ -РАПП.

Список литературы

1. Дикунец М.А., Апполонова С.А., Родченков Г.М. Одновременное определение широкого круга неконъюгированных ксенобиотиков методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией // Журн. аналит. химии. 2009. Т. 64. № 8. С. 854-864.
2. Дикунец М.А., Апполонова С.А., Родченков Г.М. Влияние матрицы на определение синтетических кортикостероидов и диуретиков методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией // Журн. физич. химии. 2009. Т. 83. № 4. С. 607-614.
3. Сычев К.С., Даванков В.А. Материалы и методы пробоподготовки в хроматографии: твердофазное концентрирование и адсорбционная очистка // Сорбционные и хроматографические процессы. 2004. Т. 4. № 1. С. 5-28.
4. Hafeli U.O. Magnetically modulated therapeutic systems // International Journal of Pharmaceutics. 2004. Vol. 277. No 1. P. 19-24.
5. Faraji M., Yamini Y., Rezaee M. Magnetic nanoparticles: synthesis, stabilization, functionalization, characterization and applications // J. Iran. Chem. Soc. 2010. Vol. 7. No 1. P. 1-37.
6. Vogeser M., Geiger A., Herrmann R., Kobold U. Sample preparation for liquid chromatography-tandem mass spectrometry using functionalized ferromagnetic micro-particles // Clinical Biochemistry. 2008. Vol. 41. No 16-17. P. 1417-1419.

7. Vogeser M., Geiger A., Herrmann R., Kobold U. Preparation of plasma samples for chromatographic analyses using functionalized ferromagnetic micro-particles manipulated in a high pressure liquid system // *Clinical Biochemistry*. 2009. Vol. 42. No 9. P. 915-918.

8. Суханова И.И., Дикунец М.А., Вирюс Э.Д., Родченков Г.М. Магнитная сепарация как новый метод экстракции низкомолекулярных соединений из биожидкости человека // *Журн. аналит. химии*. 2011. Т. 66. № 9. С. 923-930.

9. Thevis M., Kamber M., Schänzer W. Screening for metabolically stable aryl-propionamide-derived selective androgen receptor modulators for doping control purposes // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2006. Vol. 20. No 5. P. 870-876.

10. Narkar V.A., Downes M., Yu R.T., Embler E., Wang Y.X., Banayo E., Mihaylova M.M., Nelson M.C., Zou Y., Juguilon H., Kang H., Shaw R.J., Evans R.M. AMPK and PPAR β/δ agonists are exercise mimetics // *Cell*. 2008. Vol. 134. No 3. P. 405-415.

11. World Anti-Doping Agency, The 2011 Prohibited List. International standard (2011). URL: http://www.wada-ama.org/rtecontent/document/2011-Prohibited_List_ENG_Final_20_Sept_08.pdf

12. Дикунец М.А., Вирюс Э.Д., Семенистая Е.Н., Соболевский Т.Г., Родченков Г.М. Масс-спектрометрия допинговых препаратов нового поколения: агонисты дельта-рецепторов активации пролиферации пероксисом // *Масс-спектрометрия*. 2009. Т. 6. № 4. С. 307-314.

13. Thevis M., Beuck S., Thomas A., Kortner B., Köhler M., Rodchenkov G., Schänzer W. Doping control analysis of emerging drugs in human plasma – identification of GW501516, S-107, JTV-519, and S-40503 // *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2009. Vol. 23. No 8. P. 1139-1146.

14. Филиппов О.А., Тихомирова Т.И., Цизин Г.И., Золотов Ю.А. Динамическое концентрирование органических веществ на неполярных сорбентах // *Журн. аналит. химии*. 2003. Т. 58. № 5. С. 454-479.

Суханова Ирина Ивановна – инженер-исследователь, ФГУП «Антидопинговый центр» Министерства спорта, туризма и молодежной политики Российской Федерации, Москва, тел. 495-258-37-49

Дикунец Марина Александровна – в.н.с., к.х.н., ФГУП «Антидопинговый центр» Министерства спорта, туризма и молодежной политики Российской Федерации, Москва

Вирюс Эдуард Даниэлевич – в.н.с., к.х.н., ФГУП «Антидопинговый центр» Министерства спорта, туризма и молодежной политики Российской Федерации, Москва

Соболевский Тимофей Геннадиевич – зав. лаб., к.х.н., ФГУП «Антидопинговый центр» Министерства спорта, туризма и молодежной политики Российской Федерации, Москва

Родченков Григорий Михайлович – директор, к.х.н., ФГУП «Антидопинговый центр» Министерства спорта, туризма и молодежной политики Российской Федерации, Москва

Sukhanova Irina I. – researcher, Antidoping Centre, WADA Accredited Laboratory, Moscow, e-mail: i_sukhanova@mail.ru

Dikunets Marina A. – leading scientist, PhD, Antidoping Centre, WADA Accredited Laboratory, Moscow

Virus Eduard D. – leading scientist, PhD, Antidoping Centre, WADA Accredited Laboratory, Moscow

Sobolevsky Timofey G. – head of laboratory, PhD, Antidoping Centre, WADA Accredited Laboratory, Moscow

Rodchenkov Grigory M. – director, PhD, Antidoping Centre, WADA Accredited Laboratory, Moscow